

Docket No. 220257US0CIP

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Eishun TSUCHIDA, et al.

SERIAL NO: ~~New Application~~ 10/091440

FILED: ~~Herewith~~ 3-7-02

FOR: METHOD OF PRESERVING OXYGEN INFUSIONS

GAU: 1743

EXAMINER:

Wallenhurst



REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application Number PCT/JP00/05512, filed August 17, 2000, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	11-253119	September 7, 1999

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

William E. Beaumont

Registration No. 30,996



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

整理番号 A009904597

発送番号 156956

発送日 平成15年 5月13日 1 / 3

拒絶理由通知書

特許出願の番号 平成11年 特許願 第253119号
起案日 平成15年 5月 6日
特許庁審査官 守安 智 8519 4C00
特許出願人代理人 鈴江 武彦 (外 5名) 様
適用条文 第29条第2項、第37条

7.12

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものである。これについて意見があれば、この通知書の発送の日から60日以内に意見書を提出して下さい。

理 由

1. この出願は、下記の点で特許法第37条に規定する要件を満たしていない。
2. この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前日本国内又は外国において頒布された下記の刊行物に記載された発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

記 (引用文献等については引用文献等一覧参照)

本願は、特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願であるが、「特許を受ける権利を有する者が試験を行い、刊行物に発表し、又は特許庁長官が指定する学術団体が開催する研究集会において文書をもつて発表」した内容を越えた部分を包含する出願である。

したがって、特許法第30条第1項の規定の適用を認めない。

理由1.

請求項1～3は、「・・・脂質分子集合体と、・・・ヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法」；

請求項4は、「アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の保存方法」； 請求項5は、「・・・脂質分子集合体と、・・・ヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤」あるいは「アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤」の「保存方法」；

請求項6は、「・・・脂質分子集合体と、・・・ヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤」；

科学技術

請求項7は、「アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤」；

請求項8は、「・・・脂質分子集合体と、・・・ヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤」あるいは「アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤」；

請求項9は、「・・・脂質分子集合体と、・・・ヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の製造方法」；

請求項10は、「アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の製造方法」に、それぞれ係るものである。

ここで、請求項1に記載の酸素輸液剤に係る発明と請求項4に記載の酸素輸液剤に係る発明とは、異なる発明であると認める。そして、請求項1を特定発明とすると、請求項6に係る発明は、「脂質分子集合体表面がポリオキシエチレンで修飾されている」点で、請求項1に係る方法の発明の一態様に直接使用するものの発明であると解釈できるので、特許法第37条の要件を満たすものとすることができるが、請求項7、8に係る発明は、請求項1に記載のものとは異なる酸素輸液剤に係る発明である点で、特許法第37条の要件を満たしていない。また、請求項9、10に係る発明は、酸素輸液剤の製造方法に係るものである点で、特許法第37条の要件を満たしていない。

この出願は特許法第37条の規定に違反しているので、請求項1-6以外の請求項に係る発明については同法第37条以外の要件についての審査を行っていない。

理由2.

(1) 請求項：1、3 刊行物：A

刊行物Aには、ヘモグロビンを基調とする人工赤血球においては、可逆的酸素化の課程がヘム鉄を酸素結合能を有しない3価に変化させることが記載されている（第2頁左下欄）。そして、そもそも酸素輸液剤は、使用時においてのみ酸素結合能を発揮すればよいものである。そうしてみると、当業者であれば、保存時にあえて酸素存在条件下に置くとは認められないから、酸素輸液剤である水性分散液から酸素を除去することに格別の創意を認められない。そして、それによりヘムがデオキシ型であることを見出したことにも格別の困難性を認めない。

(2) 請求項：2 刊行物：A、B

(1) 参照。

より一層の安定化を求めて、刊行物Bに記載されているように、ヘモグロビン小胞体表面をポリオキシエチレンで修飾することに格別の創意を認めない。

(3) 請求項：4、5 刊行物：C、B

刊行物Cには、アルブミン-ヘムからなる酸素輸液剤が調整時にはデオキシ型

として得られることが記載されている（実施例参照）。また、そもそも酸素輸液剤は、使用時においてのみ酸素結合能を発揮すればよいものであるから、当業者であれば、製造した酸素輸液剤をオキシ型とした後に保存するとは認められないし、保存時にあえて酸素存在条件下に置くとも認められない。そうしてみると、酸素輸液剤である水溶液から酸素を除去し、また、当該水溶液を不活性ガス雰囲気下に保存することに格別の創意を認められない。そして、それによりヘムがデオキシ型であること見出したことにも格別の困難性を認めない。また、刊行物Cには、酸素の除去が不活性ガスにより行われることも記載されている（たとえば、段落番号【0044】）。

（4）請求項：6 刊行物：C, B

（2）参照。

より一層の安定化を求めて、刊行物Bに記載されているように、ヘモグロビン小胞体表面をポリオキシエチレンで修飾することに格別の創意を認めない。

この拒絶理由通知書中で指摘した請求項以外の請求項に係る発明については、現時点では、拒絶の理由を発見しない。拒絶の理由が新たに発見された場合には拒絶の理由が通知される。（なお、段落番号【0042】に「オキシヘモグロビンはでオキシヘモグロビンに変換・・・」の記載があるところ、適宜、改められたい＜「でオキシヘモグロビン」ではなく「デオキシヘモグロビン」＞。）

引用文献等一覧

A. 特開平4-59735号公報

B. 人工血液, 1999年 8月20日; Vol. 7, No. 3, p56, (新規性の喪失の例外証明書提出書参照)

C. 特開平8-301873号公報

先行技術文献調査結果の記録

・調査した分野 I P C第7版 A61K31/555

(Translation)

Mailed: May 13, 2003

NOTIFICATION OF REASONS FOR REJECTION

Patent Application No.: 253119/99

Examiner's Notice Date: May 6, 2003

Examiner : Satoru Moriyasu

This application is rejected on the grounds stated below. Any opinion about the rejection must be filed within 60 DAYS of the mailing date hereof.

REASONS

1. The application fails to satisfy the requirements under the main provision of Section 37 in the following respect(s).
2. The invention is unpatentable under Section 29 (2) of the Patent Law, as being such that the invention could easily have been made by a person with ordinary skill in the art to which the invention pertains, on the basis of the invention described in the following publication(s) distributed in Japan or a foreign country prior to this application.

REMARKS

With regard to Reason 2:

(1) Claims: 1 and 3, Publication: A

Publication A discloses that in an artificial erythrocyte in which hemoglobin is dominant, the step of the reversible oxygenation converts heme iron into a trivalent type that has no oxygen binding capacity. (See page 2, lower left column.) In the first place, it suffices if an oxygen infusion agent can exhibit the oxygen binding capacity when it is actually used. Therefore, it is not considered that a person having ordinary skill in the art dares to place it under an oxygen existing condition when preserving it. Therefore, it is not considered particularly inventive to remove oxygen from an aqueous dispersion that is oxygen infusion agent. Further, it is not considered particularly difficult to discover thereby that heme is of a deoxy type.

(2) Claim: 2, Publications : A and B

See (1).

It is not considered particularly inventive to modify the surface of hemoglobin endoplasmic reticulum with polyoxyethylene as described in Publication B for better stabilization.

(3) Claims: 4 and 5, Publications : C and B

Publication C discloses that an oxygen infusion agent made of albumin-heme is obtained in the form of deoxy type when preparing it. Further, in the first place, it suffices if an oxygen infusion agent can exhibit the oxygen binding capacity when it is actually used. Therefore, it is not considered that a person having ordinary skill in the art dares to reserve a prepared oxygen infusion agent after converting it to an oxy type, and to place it under an oxygen existing condition when preserving it. Therefore, it is not considered particularly inventive to remove oxygen from an aqueous solution that is oxygen infusion agent, or to preserve the aqueous solution under an inert gas atmosphere. Further, it is not considered particularly difficult to discover thereby that heme is of a deoxy type. Publication C discloses that the removal of oxygen is carried out with the inert gas. (See paragraph [0044], for example.)

(4) Claim: 6, Publications : C and B

See (2).

It is not considered particularly inventive to modify the surface of hemoglobin endoplasmic reticulum with polyoxyethylene as described in Publication B for better stabilization.

The claims not mentioned in this Official Action are not rejected. If a new reason for rejection is noticed, a further Official Action will be issued.)

LIST OF REFERENCES

A. Jpn. Pat. Appln. KOKAI Publication No. 4-59725

B. Artificial Blood, August 20, 1999, Vol. 7, No. 3, p56 (See the document submitted as a certificate for exceptions to lack of novelty of invention.)

C. Jpn. Pat. Appln. KOKAI Publication No. 8-301873

Prior Art Search Report

Searched Field: IPC 7th ed. A61K31/555

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月 7日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第253119号

[ST.10/C]:

[JP1999-253119]

出 願 人

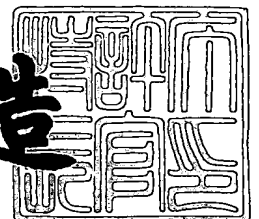
Applicant(s):

科学技術振興事業団

2002年 2月 1日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3003779

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009904597

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成11年 9月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/805

【発明の名称】 安定保存可能な酸素輸液剤

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都練馬区関町南 2 丁目 1 0 番 1 0 号

 【氏名】 土田 英俊

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区西早稲田 2 - 1 - 2 6 - 4 0 2

 【氏名】 酒井 宏水

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都府中市天神町 4 丁目 5 番 4 号

 【氏名】 富山 賢一

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区玉川 3 丁目 4 0 番 1 6 号 フォレスト玉
 川 4 0 4 号

 【氏名】 武岡 真司

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区西早稲田 2 丁目 1 1 番 1 0 号

 【氏名】 宗 慶太郎

【特許出願人】

 【識別番号】 000218719

 【氏名又は名称】 土田 英俊

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9404002

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 安定保存可能な酸素輸液剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水性分散液から酸素を除去した、前記ヘムまたはヘム誘導体のデオキシ型にすることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法であって、更に、前記脂質分子集合体表面をポリオキシエチレンで修飾することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の方法であって、前記脂質分子集合体が、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、およびリピドヘムートリグリセリド小球体からなる群から選択される酸素輸液剤の保存方法。

【請求項 4】 アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水溶液から酸素を除去して、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることと；

この酸素を除去された水溶液を不活性ガス雰囲気下で保存することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記酸素の除去は、不活性ガスとのガス交換により行われることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

【請求項 6】 水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する酸素輸液剤であって：

前記脂質分子集合体表面がポリオキシエチレンで修飾されていることと

；

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に収容されていることを特徴とする酸素輸液剤。

【請求項 7】 アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤であって：

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に収容されていることとを特徴とする酸素輸液剤。

【請求項 8】 請求項 6 または 7 に記載の酸素輸液剤であって、更に、生理学的に許容可能な還元剤を含有することを特徴とする酸素輸液剤。

【請求項 9】 水性媒質中に分散された脂質分子構造体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

表面がポリオキシエチレンで修飾され、且つ前記ヘムまたはヘム誘導体を含んだ前記脂質分子集合体の水性分散液を調製する工程と；

該水性分散液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水性分散液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

【請求項 10】 アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

アルブミン-ヘムを含有する水溶液を調製する工程と；

該水溶液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水溶液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酸素輸液剤を長期保存する方法、長期保存に適した酸素輸液剤、お

よび該酸素輸液剤の製造方法に関する。

【0002】

本発明の酸素輸液剤は医学および薬学での広い応用が可能であり、また輸血用血液と同様、そのまま或いは必要に応じ添加物を加えた状態で、血液代替物として臨床治療に利用される。

【0003】

【従来の技術】

人血を血管内に注入する現行の輸血システムには、次のような問題点が指摘されている：

- 1) 感染（肝炎、エイズウイルスなど）の可能性があること；
- 2) 赤血球の保存期限が3週間であること；
- 3) 高齢化社会の到来で、輸血患者のうち高齢者の割合が高くなる一方、健康献血者総数が低下し続けているため、献血の一回当たりの量を400mL迄に増やしても需要を満たせなくなる可能性があること；
- 4) 保存中に汚染の危険があること；
- 5) 信仰上の理由で輸血を拒否する患者に対して適用できないこと；
- 6) 災害時の緊急需要に対し、大量供給ができないこと。

【0004】

従って、血液型に関係なく何時でも即応できる代替物に対する要求が大きく、その一つとして、電解質輸液、膠質輸液等の輸液製剤が従来広く使用されてきた。しかし、これらの輸液製剤は血液の最も重要な機能、即ち酸素を運搬する赤血球機能の代替機能を有していないため、この酸素運搬機能をも代替できる酸素輸液剤（人工赤血球）の開発が極めて重要になっている。従来の酸素輸液剤としては、パーフルオロカーボン誘導体が高い酸素溶解度を示すことから、これを懸濁させた酸素輸液剤が知られており、これについては現在臨床試験が進んでいる。また、酸素の結合および解離能を有するヘムタンパク質であるヘモグロビン（ヒトヘモグロビン、ウシヘモグロビン、および組換えヘモグロビン）を用いた酸素輸液剤の開発も進められており、分子内架橋ヘモグロビン、水溶性高分子結合ヘモグロビン、分子間架橋重合ヘモグロビンなどの臨床試験が欧米で進行しているが

、非細胞型構造に起因する各種の副作用が明らかにされている。

【0005】

ヘモグロビン（Hb）が本来赤血球膜に包まれている理由として、下記の事項が考えられる：

- 1) 35%濃度の濃厚Hb溶液による高い粘度および膠質浸透圧の影響を抑制すること；
- 2) 生理活性の高いヘモグロビンを膜内に封じ込めることにより、その逸脱を抑制すること；
- 3) Hb機能を維持するための各種リン酸、解糖・還元酵素系を同一系内に保持すること；および
- 4) 血球分散系は非ニュートン性流体であり、体内（特に末梢血管）循環において特色ある流動形式により生理作用を示す利点があること。

【0006】

上記のような赤血球構造の本来の役割を考慮すれば、酸素輸液剤としては、ヘモグロビンをカプセル封入した粒子の分散系が適切であることは明らかである。一方、生体成分であるリン脂質が単独で小胞構造を形成することが発見され、DjordjevicとMillerがリン脂質／コレステロール／脂肪酸から成るリポソームを利用したヘモグロビン小胞体の検討を開始して以来、多くの機関でヘモグロビン小胞体の研究が進められてきた。ヘモグロビン小胞体の使用には、1) 天然のヘモグロビンがそのまま使えること、2) ヘモグロビン由来の副作用を抑制できること、3) 粘度や膠質浸透圧、酸素親和度を任意の値に調節できること、4) 体内血中滞留時間を延長できること等の利点がある。

【0007】

ヘモグロビンの酸素結合部位であるヘム（プロトポルフィリンIX）は、グロビンから逸脱すると同時に酸素結合能を失うことは当業者には周知であり、グロビン鎖の構築する立体枠組みの役割と疎水場の重要性は良く認識されていた。そこで、グロビンの機能代替ができる系の開発に力が注がれてきた。本発明者らは、各種ポルフィリン誘導体について検討した結果、水相系で可逆的に酸素を結合する能力を有するリピドヘム（ヘム結合脂質）：5,10,15,20-テトラキス[α , α ,

α, α -o-[2', 2'-ジメチル-20' (2"-トリメチルアミノエチル) ホスホナトキシエ
イコサナミド]-フェニル]ポルフィナト鉄(II) [5,10,15,20-tetrakis[$\alpha, \alpha, \alpha,$
 α -o-[2', 2'-dimethyl-20' (2"-trimethylammonioethyl)phosphonat-oxyeicosana
mido]-phenyl]porphyrinato iron(II)] およびその他の合成に成功した。このリ
ピドヘムをリン脂質と混合して水相に分散処理することにより構成されるリピド
ヘム小胞体では、リピドヘムがリン脂質膜疎水場に包埋され分散配向している。
水相分散系にある粒径の揃ったリピドヘム小胞体では、生理条件下にある赤血球
内ヘモグロビンと同様に、可逆的な酸素配位が可能となることが観測されている。
かくして、血液と同じヘム濃度の赤い色をしたこの水相系は、全合成による酸
素輸液剤として誕生した (E.Hasegawa, et. al., Biochem. Biophys. Res. Comm
un. vol.105, 1416-1419, 1982)。動物投与試験も詳細になされ、出血ショック
モデル犬の蘇生試験では、ヘム濃度に応じた酸素運搬力が確認された。栄養油剤
(精製大豆油、トリグリセリド)の油滴小球の周りをリピドヘムで覆ったリピド
ヘムトリグリセリド小胞体の酸素輸送能も確認されている (小松ら、人工臓器
, vol. 22, 550-553, 1993)。また、ヘム誘導体である2-[8-{N-(2-メチルイミ
ダゾリル)}オクタノイロキシメチル]-5,10,15,20-テトラキス($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-ピ
バラミド)フェニルポルフィナト鉄(II) (2-[8-{N-(2-methylimidazolyl)} octano
yloxymethyl] -5,10,15,20-tetrakis($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-pivalamido)phenylporphyrin
atoiron(II))等を、ヒト由来アルブミンまたは組換えアルブミンの疎水ポッケ
ットに吸着させた酸素輸液剤 (アルブミン-ヘムと称する) が合成され、その酸素
運搬能が確認されている (E.Tsuchida, et al., Bioconjugate Chemistry, vol.
8, 534-538, 1997)。

【0008】

欧米における酸素輸液剤の開発は、当初は軍事目的の色彩を帯びていたが、冷
戦後の医療現場においては、単なる出血ショック蘇生の目的だけでなく、様々な
使用目的 (術前血液希釈、体外循環、鎌形赤血球貧血病、卒中、臓器保存、昇圧
剤、一酸化炭素中毒、癌治療、液体換気、動物臨床医療など) での適用が考慮さ
れている。また、献血・輸血システムの整備が遅れ、輸血用血液が慢性的に不足
している途上国で大きな需要があることから、その研究開発は世界規模に拡大さ

れている。日本では、起源切れ赤血球の有効利用の意味もあり、本研究を推進している現状である。

【0009】

酸素輸液剤の保存形態としては、冷蔵保存、凍結保存、および凍結乾燥した粉末状態での保存が知られている。一般にリン脂質小胞体は構造が不安定であり、またオキシヘモグロビンやオキシ型ヘム誘導体の酸素結合部位であるヘムは酸化反応を受けやすい。従って酸素輸液剤を冷蔵保存すると、粒子の凝集と融合、また構成成分が酸化され、過酸化脂質の生成、メトヘモグロビンやヘム誘導体の酸化体の生成などの劣化反応が起り、投与が出来ない状態になる場合がある。

【0010】

ヘモグロビン小胞体やリピドヘム小胞体において、重合性のリン脂質を小胞体の構成成分とし、 γ 線や紫外線照射によってこれを重合することにより小胞体構造を極めて安定にすることができる。この場合、分散液を液体窒素で急速冷凍して長期保存が可能となる。凍結融解を10回繰り返してもヘモグロビンの漏出はなく、また粒径も変化せず、酸素結合解離曲線にも変動が無い (Sato et al., ASAIO Journal, vol.38, M580-M584, 1992)。また、この系にマルトースやスクロースなどの糖を添加し、凍結乾燥して得られる粉末は極めて安定である。例えばヘモグロビン小胞体の場合、20週間4℃で保存した後、純水を添加して再溶解させた後の物性解析では、メトヘモグロビン含量の増大は認められず、ヘモグロビンの漏出も無く、また小胞体の粒径が変化しておらず、凍結乾燥前の状態とほぼ同等であることが確認されている (Wang et al., Polymer Adv. Technol., vol.4, 8-11, 1992)。

【0011】

ポリオキシエチレンを結合した脂質を、リン脂質小胞体の表面に導入する方法は良く知られている。その目的は、血中滞留時間を延長させて封入した抗癌剤を腫瘍組織に効率良く運搬することであり、既に臨床試験も最終段階となり、その安全性は十分に認められている。また、ヘモグロビン小胞体と血中蛋白質との相互作用を抑制させることを目的として、ヘモグロビン小胞体の表面にポリオキシエチレンを結合させている報告もある (リポソーム表面への蛋白質吸着抑制剤、

公開特許公報、平3-218309；リポソームおよびその製法、公開特許公報、平7-20857)。また、ポリオキシエチレンで表面修飾することにより、血中での血流動態が改善されることも確認されている (Sakai et al., Bioconjugate Chemistry, vol.8, 23-30, 1997)。しかし、酸素輸液剤の保存に関して、このポリオキシエチレン修飾法を利用することは知られていなかった。

【0012】

ヘモグロビン、リポドヘム、およびヘム誘導体は、そのヘムの中心元素である鉄が二価鉄 (Fe^{2+}) のときには酸素を可逆的に結合するのに対して、酸化型の三価鉄 (Fe^{3+}) であるときは酸素結合能が無い。また酸素を結合した二価鉄錯体でも、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を遊離して次第に自動酸化し、三価鉄 (メト体) となって酸素結合能を失う。更に、メト体からはヘムおよび鉄イオンが遊離し易くなるので、生体への悪影響が懸念される。この酸化反応を抑制する方法としては、単に冷蔵保存して反応速度を低下させることも可能であるが、次第に三価鉄が増大する。これに対する対策として、赤血球に本来存在しているメトヘモグロビン還元酵素系や、カタラーゼおよびスーパーオキシドディスムターゼなどの活性酸素を消去する酵素を添加する方法も知れている。また、ヘモグロビンおよびヘム誘導体に対して酸素の200倍の親和度を示す一酸化炭素 (CO) を結合させて二価鉄の状態を保ち、極めて長期間に亘って酸化を抑制することもできる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

酸素輸液剤 (ヘモグロビン小胞体、リポドヘム小胞体、リポドヘムトリグリセリド小球体、アルブミン-ヘムなど) のこれまでの保存方法には以下に示す問題があり、酸素輸液剤としての本来の開発目的にはそぐわない。

【0014】

保存形態として、凍結保存、凍結乾燥粉末としての保存がある。しかし、凍結体はこれを融解する手間がかかり、また粉末を溶解させる際には溶解までに時間を必要とする上に、気泡が発生してこれを除去する必要があるなどの煩雑さを伴う等の問題点が指摘されている。従って、凍結保存、凍結乾燥粉末保存は好まし

くない。

【0015】

メトヘモグロビン還元酵素系や活性酸素消去酵素を添加する方法では、長期保存中に酵素活性が低下し、一定の値を取らない場合がある。また、酸素輸液剤を一酸化炭素雰囲気で冷蔵保存すると、ヘムの二価鉄の状態が保たれ、三価鉄への酸化反応は抑制されるが、大量の一酸化炭素は有害であり、また結合した一酸化炭素を除去しない限り酸素結合能が無いので、このままでの投与はできない。オキシ型に変換した後の冷蔵保存では、三価鉄状態への酸化が次第に進行し、酸素運搬能の低下が著しい。二価鉄状態のヘモグロビンの酸素分圧と酸化速度の相関は良く知られており、デオキシヘモグロビン小胞体では酸化反応が進行しないことは実験的に確認されている(Sakai et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1994, 11 20-1125; Takeoka et al., Bioconjugate Chem., vol.8, 539-544, 1997)。

【0016】

また、ヘモグロビンおよびヘム誘導体の酸化反応が抑制されたとしても、酸素輸液剤の保存にはもう一つ別の障害がある。即ち、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、リピドヘム-トリグリセリド小球体のように、ヘムの周囲環境を形成している脂質分子集合体構造は、共有結合を介さずに成分分子間の相互作用力（疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合など）から構成されているため不安定な場合が多く、生理塩水に分散させて冷蔵保存すると、次第に凝集体を形成し、融合して粒径が変化するので、何らかの構造安定化が望まれていた。

【0017】

本発明者等は、酸素輸液剤について永年にわたり系統的な研究を重ねているものであるが、酸素輸液剤の長期室温棚置き保存の技術手段を確立することを課題として鋭意努力した結果、上記諸問題を解決し、当該課題を達成したものである。

【0018】

【課題を解決するための手段】

上記の課題は、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保

存方法であって：

前記水性分散液から酸素を除去した、前記ヘムまたはヘム誘導体のデオキシ型にすることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法によって達成される。

【0019】

本発明のもう一つの側面によれば、アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水溶液から酸素を除去して、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることと；

この酸素を除去された水溶液を不活性ガス雰囲気中で保存することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法が提供される。

【0020】

本発明のもう一つ側面によれば、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する酸素輸液剤であって：

前記脂質分子集合体体表面がポリオキシエチレンで修飾されていることと；

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に充填されていることを特徴とする長期保存性に優れた酸素輸液剤が提供される。

【0021】

本発明の別の側面によれば、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

表面がポリオキシエチレンで修飾され、且つ前記ヘムまたはヘム誘導体を含んだ前記脂質分子集合体の水性分散液を調製する工程と；

該水性分散液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水性分散液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備した

ことを特徴とする長期保存性に優れた酸素輸液剤の製造方法が提供される。

【 0 0 2 2 】

本発明の更に別の側面によれば、アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

アルブミン-ヘムを含有する水溶液を調製する工程と；

該水溶液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水溶液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法が提供される。

【 0 0 2 3 】

【発明の実施の形態】

本発明において、「脂質分子集合体」とは、脂質および／またはリポタンパク質によって、共有結合を介さずに、水性媒質中における分子間の相互作用（疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合など）により構成された膜構造体を言う。典型的には小胞体（リボソーム）および小球体（マイクロスフィア）が挙げられるが、広義には赤血球膜等の細胞膜も含まれる。更に、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、リピドヘム-トリグリセリド小球体もまた、脂質分子集合体からなる小胞体の典型例である。

【 0 0 2 4 】

本発明において、「ヘムまたはその誘導体」とは、ヘムだけでなく、ヘムのポルフィリン環が変形されたヘム誘導体のうち、酸素との可逆的な結合能を有するものの全てを包含する。

【 0 0 2 5 】

本発明における「水性媒質」には、水および全ての生理学的に許容可能な全ての水溶液、例えば、電解質水溶液、緩衝液、タンパク質水溶液、脂質エマルジョン水溶液、血漿およびこれらの組み合わせが含まれる。

【 0 0 2 6 】

本発明における不活性ガスとは、化学的に不活性なガスを意味し、例えばヘリ

ウム、アルゴン、ネオンなどの希ガスに加えて、窒素が含まれる。経済的な理由からは窒素ガスが好ましい。

【 0 0 2 7 】

次に、本発明の構成を詳しく説明すれば次の通りである。

【 0 0 2 8 】

既報に従って調製したヘモグロビン小球体(Sakai et al., *Biotechnology Progress*, vol. 12, 119-125, 1996)、リピドヘム小胞体(E. Hasegawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 105, 1416-1419, 1982)、リピドヘム-トリグリセリド小胞体(小松ら、*人工臓器*, vol. 22, 550-553, 1993)、およびアルブミン-ヘム(E. Tsuchida et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, 534-538, 1997)の生理塩水溶液について、ヘムが鉄二価の状態であることを確認した後、この分散液を所定の成分濃度(例えばヘモグロビン濃10g/dL、ヘム濃度6.2mM)に調節し、分散液から酸素を除去する。除去方法としては、酸素を含まない窒素またはその他の不活性ガス(アルゴン、ヘリウムなど)に曝して、溶解している酸素を排気させる。この操作をすることによりオキシ型のヘムは酸素を結合していないデオキシ型ヘムに変換させる。このためには、上記酸素輸液剤を硝子瓶などの酸素を透過しない密封性の容器に封入後、容器内でこの気体の気泡を発生させて通気することで溶存酸素を排気する。

【 0 0 2 9 】

溶存酸素濃度は、クラーク式酸素電極を分散液に漬けて酸素分圧をモニターする方法、容器内の気相を採取してこれをガスクロマトグラフィーにて測定する方法、または容器内のヘモグロビンおよびヘムの特徴ある可視もしくは近赤外スペクトルの測定から、オキシ型とデオキシ型の比率を算出する方法により知ることができる。このようにして得られたデオキシ型の各酸素輸液剤は、酸素を遮断して保存することにより、ヘモグロビンおよびヘムの酸化、また脂質などその他の成分の酸素酸化を抑制することができる。

【 0 0 3 0 】

酸素除去操作後に、溶液中に残存している微量の酸素を更に除去することを目的として、小胞体中、或いは溶液中に適量のチオール類(ホモシステイン、アセ

チルシステイン、グルタチオンなど)、アスコルビン酸、亜ニチオン酸などのような酸素と反応する試薬を少量溶存させても良い。

【0031】

上記のようにして得られたデオキシ型の各酸素輸液剤は、酸素を遮断して保存するために、例えば硝子瓶に直接封入したり、アルミニウム/ポリエチレン層状バッグ(aluminized polyethylene bag)や、ポリ塩化ビニリデン系、エチレンービニルアルコール共重合体系など、酸素透過性が極めて低い材質から成る容器に入れて封入したり、またはプラスチック製バックに封入しこれを更に酸素を透過しない容器に入れる。保存温度は、-20℃～60℃の間で可能であるが、好ましくは4～25℃の冷暗所保存をする。以上の操作により、ヘモグロビンおよびヘムの酸化、また脂質などその他の成分の酸素酸化を抑制することができる。

【0032】

上記の酸素除去に加えて、ヘモグロビン小胞体、リポドヘム小胞体、およびリポドヘムトリグリセリド小球体の場合は、粒子表面に保存安定度向上のためにポリオキシエチレンを予め結合させるのが好ましい。このためには、ポリオキシエチレンを結合した脂質(ポリオキシエチレン脂質)の分散液を4～37℃で添加する。本脂質の疎水性部分は粒子表面の脂質膜中に挿入され、親水性のポリオキシエチレン鎖が水相に伸びた状態で固定される(Sakai et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 8, 23-30, 1997)。操作温度が高いほど導入速度が速いが、冷却して行っても良い。また小胞体の膜成分としてコレステロールを多く含むため、明確な相転移温度は無いが、成分リン脂質の相転移温度以下でも十分に導入される。ポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖分子量は、1,000～20,000で良く、導入量は、粒子の外層に面している脂質総量に対して、0.01～3mol%、好ましくは0.05～0.3mol%導入する。ポリオキシエチレン脂質の疎水性部分はエタノールアミン型リン脂質、コレステロール、アルキル鎖結合グルタミン酸、アルキル鎖結合リジンなどがある。ポリオキシエチレンと脂質部分の結合様式は、エステル結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合などがある。ポリオキシエチレンを粒子表面に導入することで保存中の凝集と融合による粒径変化を抑え、またヘモグロビン小胞体の場合、ヘモグロビンをはじめとする内包物の漏

出を防ぐことができる。

【 0 0 3 3 】

上記の構成からなる本発明の作用は次の通りである。本発明は、酸素を除去することで酸素輸液剤中のヘモグロビンおよびヘム誘導体の酸化を抑制する。この酸化抑制の効果により、保存中のスーパーオキシドアニオンや過酸化水素の発生が防止され、従って、ヘムおよびヘム誘導体を担持する脂質分子集合体の酸化および変性が防止される。その結果、脂質分子集合体の物理的安定性が向上し、粒径変化および凝集体の形成が防止されるので、脂質分子集合体からなる酸素輸液剤の保存寿命が向上する。

【 0 0 3 4 】

加えて、分子集合体であるヘモグロビン小胞体、リポドヘム小胞体、およびリポドヘム-トリグリセリド小球体の表面にポリオキシエチレンを導入することにより、これら粒子の脂質分子集合体を更に安定化させることができる。従って、保存中の粒子の凝集と融合による粒径変化や、ヘモグロビンをはじめとする内包物の漏出等を効果的に防止し、酸素輸液剤の保存安定性を更に向上させることができる。

【 0 0 3 5 】

本発明において留意すべきことは、ヘム鉄の二価から三価への酸化と脂質分子集合体構造の不安定性との間には、相互に他を助長する関係が存在することである。即ち、ヘム鉄の酸化に伴って発生したスーパーオキシドアニオン (O_2^-) や過酸化水素、およびそれによって生じるフェリルヘモグロビンは、リン脂質等の脂質分子集合体の構成成分を酸化して、脂質分子集合体の崩壊を助長する。また、脂質分子集合体の崩壊は、ヘム鉄の存在環境を悪化させて酸化を助長する可能性がある。本発明はこの点に着目し、ヘムおよびヘム誘導体の酸化抑制と、ヘムおよびヘム誘導体のキャリアである脂質分子集合体の安定化とを同時に達成することにより、従来達成され得なかった酸素輸液剤の室温棚置き保存を可能とする。

【 0 0 3 6 】

なお、アルブミン-ヘム水溶液を用いた酸素輸液剤は溶液の状態で安定である

ため、脂質分子集合体構造は採用されない。従って、脂質分子集合体構造の安定化という作用効果とは直接関係はないが、酸素を除去した状態で保存することによりヘムのメト化を防止し、保存性を顕著に向上できる点においては同様である。

【0037】

得られる脱酸素型の酸素輸液剤は長期保存が可能となるので、医療機関の各部署、救急車、医療機関が無い遠隔地などに常備することにより、必要時に直ちに体内投与することが可能になる。デオキシ型とした各酸素輸液剤は、空気に曝すと直ちに酸素を結合してオキシ型となる。また、デオキシ型のまま静脈内投与しても、先ず肺を通過するときに直ちに酸素と結合してオキシ型となり、末梢にて酸素を放出する。

【0038】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をより詳しく説明する。

【0039】

実施例 1

無菌的雰囲気において、献血液由来のヒト赤血球から精製して得た高純度ストロマフリーヘモグロビン溶液(40g/dL)に、ピリドキサル 5'-リン酸を、ヘモグロビンに対して3倍モルとなるように添加した。また、ホモシステインを濃度5mMとなるように添加し、更に1M- Na_2CO_3 によりpHを7.4とした。Remolino(Millipore社)を用いて孔径 $0.22\mu\text{m}$ のFMマイクロフィルター(富士フィルム)で濾過し、仕込みヘモグロビン溶液を得た。次いで、混合脂質粉末Presone PPG-I(ホスファチジルコリン/コレステロール/ホスファチジルグリセロールの混合物)を脂質濃度が4.5wt%となるように少量ずつ添加し、4℃で終夜攪拌して、ヘモグロビン内包多重層小胞体を得た。Remolinoを用いたエクストルージョン法により、これら小胞体の粒径及び被覆総数の制御を行った。ステンレス製焼結板(孔径 $10\mu\text{m}$)を使用し、FMマイクロフィルターを孔径3, 0.8, 0.65, 0.45, 0.3, $0.22\mu\text{m}$ の順に使用した。得られたヘモグロビン小胞体溶液を生理食塩水で希釈し、超遠心分離(50,000g, 40 min)後に上澄みヘモグロビン溶液を吸引除去した。

【0040】

生理食塩水に溶解させたポリオキシエチレン結合脂質、N-(モノメトキシポリオキシエチレン-カルバミル)ジステアロイルホスファチジル-エタノールアミン [N-(monomethoxy polyoxyethylene-carbonyl)distearoyl phosphatidyl-ethanolamine] (ポリオキシエチレン鎖の分子量は5300) を、小胞体外表面の脂質の0.3mol%分に対応する量で滴下した。これを25℃で2時間攪拌した後、4℃で終夜攪拌して、ヘモグロビン小胞体の表面をポリオキシエチレンで修飾した。

【0041】

円筒型フラスコにヘモグロビン小胞体分散液 (0.5g/dL, 200mL) を入れ、これをロータリーエバポレータに装填して回転 (56 rpm) させた。これによって形成された液膜に、ハロゲンランプ (500W) を用いて酸素通気下 (1L/min) で3分間可視光を照射し、一酸化炭素結合ヘモグロビン (HbCO) からオキシヘモグロビン (HbO₂) への配位子交換を行った。該分散液を超遠心分離 (50,000g, 60 min) してヘモグロビン小胞体粒子を沈降させ、外水相生理食塩水を除去した後、分散媒としてリン酸緩衝生理食塩水を加えて再分散させた。ヘモグロビン濃度を10g/dLとし、Dismic-25: 0.45 μm フィルター (ADVANTEC) で濾過して、ポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体を得た。

【0042】

上記で得たポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液30mLを、100mL容量のバイアル瓶に入れて密封した。滅菌ディスクフィルターを通し更に水蒸気飽和させた窒素ガスを瓶内に導き、小胞体分散液中でバブリングさせて、溶解している酸素を除去した。系内の酸素分圧をクラーク型酸素電極 (酸素分圧測定装置, =Po₂-100, Inter Medical) によってモニターしたところ、酸素分圧が1mmHgまで低下した。この操作により、オキシヘモグロビンはオキシヘモグロビンに変換されたと判断した。

【0043】

こうして得られた本発明の酸素輸液剤について、保存試験を行った。保存条件としては冷蔵保存 (4℃)、室温保存 (23℃)、恒温槽保存 (40℃) を設定し、それぞれの試料について1年後まで、以下の測定を行って保存前の試料と比

較した。

【 0 0 4 4 】

①試料30 μ Lを生理食塩水で100倍に希釈し、室温において1 mmセルを用いて300～900nmまで紫外可視吸収スペクトル測定を行った。保存前の試料と比較して、新たな吸収極大の出現の有無や、Q帯ピークの出現波長のずれについて検討した。

【 0 0 4 5 】

②試料の沈澱形成の有無を目視により確認した。また試料30 μ Lを生理食塩水で10倍に希釈し、室温において1mmセルを用いて900 nmの吸光度を測定した。生理食塩水の900nmの吸光度をリファレンスとして差し引き、試料の濁度とした。

【 0 0 4 6 】

③試料約0.2mLをりん酸緩衝生理食塩水（P B S）で200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15min)を行った後、上澄み液のヘモグロビン定量を行って溶血の有無を確認した。

【 0 0 4 7 】

④粒径分布は、25℃において、Sub-micron Particle Analyzr Model N4-SD (Coulter Corporate Communications)を用いて動的光散乱法により測定した。

【 0 0 4 8 】

⑤Hemox-Analyzer(TCS Medical Prducts Co.)を用いて酸素結合解離曲線を測定し、その解析から酸素親和度(P_{50})、酸素運搬効率(OTE)、Hill係数を算出した。

【 0 0 4 9 】

⑥脂質の分解を検討するため、試料約0.2mLを凍結乾燥させた後、 $CHCl_3$ により脂質を抽出し、展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/28%アンモニア=13/7 / 1(容量比) および、クロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水=10/4/2 / 2/1(容量比)を用いて二次元薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート)を測定した。

【 0 0 5 0 】

⑦試料約0.2mLを凍結乾燥させた後で、約1mLの $CDCl_3$ により膜成分を抽出し、

フィルター濾過した後、 ^1H -NMRスペクトル(JNM-LA500、日本電子)を測定した。また外水相に遊離したポリオキシエチレン鎖を除去するため、試料約0.2 mLをPBSで約200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15min)を行って上澄み液を除去した。沈澱をPBSで再分散させた後で凍結乾燥させ、約1 mLの CDCl_3 により膜成分を抽出し、フィルター濾過をした後に、 ^1H -NMRスペクトルを測定した。ポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖メチレン基プロトンのピークは、 δ :3.63ppmに、ホスファチジルコリンのコリンメチルプロトンのピークは δ :3.39ppmに出現する。各々のプロトン数の比が積分比B/Aに等しいとして、ポリオキシエチレン鎖の導入率は次式に従って算出した。

【0051】

(外水相除去後の積分比B/A) \div (仕込みの積分比) $\times 100$ 。

【0052】

図1に、保存中におけるヘモグロビン小胞体分散液の諸物性値の推移を示す。いずれの試料についても、1年の保存期間中に、紫外可視吸収スペクトルにおけるメト体由来の630nmの新たなピークの出現、Q帯およびSoret帯の吸光度の変化、および波長のずれはいずれも確認されなかった。また溶血は認められず、二次元薄層クロマトグラフィーにおいて遊離の脂肪酸は観察されなかった。いずれの試料においても、保存6カ月後では、凝集による沈澱は観測されず、粒径や濁度も殆ど変化しなかった。また、40℃・6カ月後のポリオキシエチレン鎖の導入率は、保存前と比較して7%程度の低下に留まった。 P_{50} の減少傾向は、40℃・6カ月後でも保存前と比較して5.5Torrの減少に過ぎず、この程度の減少ではヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能に問題は無いと判断された。しかし40℃・1年後では、脂質の分解と、 P_{50} が43Torrにまで増大する現象が観測された。保存後の初期メト化率はいずれの試料においても低下し、保存1カ月後までには1%未満となる傾向が認められた。これはホモシステインにより酸化型メトヘモグロビンが還元されたためである。以上から、窒素雰囲気下ではポリオキシエチレン鎖で表面修飾したヘモグロビン小胞体は、40℃では6カ月間、23℃では1年間は棚置き保存が可能であることが判明した。

【0053】

実施例 2

ポリオキシエチレン修飾をしていないヘモグロビン小胞体分散液を実施例 1 と同様に調製し、バイアル瓶に入れて密封し、滅菌ディスクフィルターを通した窒素をバブリングさせて通気し、溶解している酸素を完全に除去した。系内の酸素分圧を酸素分圧測定装置(Po_2 -100, Inter Medicals社)でモニターし、2 Torrにまで低下したことを確認した。この操作により、オキシヘモグロビンはデオキシヘモグロビンにほぼ変換された。

【0054】

こうして得られた比較例酸素輸液剤について保存試験を行った。保存条件として冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を設定し、それぞれの試料について6カ月後まで以下の測定を行い、保存前の試料と比較した。試料の沈澱形成の有無を目視により確認した。また試料30 μL を生理食塩水で10倍に希釈し、室温において1 mmセルを用いて900nmの吸光度を測定した。生理食塩水の900nmの吸光度をリファレンスとして差し引き、試料の濁度とした。粒径分布測定は、25℃において、Sub-micron Particle Analyzer Model N4 SD (Coulter Corporate Communications)を用いて動的散乱法により測定した。

【0055】

メトヘモグロビン含量の増大は全く認められず、保存1カ月後はほぼ一定に推移した。粒径の増大については、保存1週間後には8%程度増大して凝集による沈澱も若干観察されたが、未だ使用可能な状態であった。これに対して、酸素除去を行わなかった場合には、保存1週間後には最早使用不能な状態にまで沈殿を生じるから、酸素除去がヘモグロビン小胞体の安定化にも寄与したことが分かる。

【0056】

しかし、実施例1の結果との比較においては、いずれの試料も保存に伴って粒径が急激に増大している。この結果は、ヘモグロビン小胞体の表面をポリオキシエチレンで修飾することと、無酸素の条件下で保存することとが相乗的に作用して、更に顕著な保存安定性が得られたことを示している。

【0057】

実施例 3

実施例 1 と同様にして調製したポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液（ポリオキシエチレンの分子量は 2 0 0 0）を実施例 1 記載の方法と同様に調製した。このデオキシ体を窒素雰囲気下でアルミニウムバッグ(Aluminized polyethylene bag, ジーエルサイエンス社製)の中に移して酸素を遮断し、冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を行った。それぞれの試料について 1 年後まで実施例 1 と同様の測定を行い、同様の結果を得た。

【 0 0 5 8 】

実施例 4

実施例 1 の調製法に記載のホモシステインをグルタチオンに換え、またポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖分子量を 10,000 とし、同様にしてポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液(50mL)を調製した。これを円筒型フラスコ(2L)に入れ、ロータリーエバポレータに装填して回転(60rpm)させることにより生じるヘモグロビン小胞体分散液の液膜に窒素を通気(1.0L/min)し、酸素を除去した。近赤外非侵襲酸素モニタ(OM-200型、島津)によって、全ヘモグロビンの98%以上がデオキシヘモグロビンであることを確認した。これを凍結保存用パックCryocyte(Baxter)に密封し、更にこれをアルミ缶に封入して酸素の透過を遮断し、保存試験を行った。保存条件としては、冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を設定し、それぞれの試料について 1 年後まで実施例 1 と同様の測定を行い、同様の結果を得た。

【 0 0 5 9 】

実施例 5

リピドヘム小胞体分散液の調製には、リピドヘム (5,10,15,20-テトラキス[α , α , α , α -o-{2', 2'-ジメチル-20' (2"-トリメチルアンモニオエチル)ホスホナトキシエイコサナミド}-フェニル]ポルフィナト鉄(II)) / 1-ステアリルイミダゾール / ジパルミトイルホスファチジルコリン / コレステロール / ポリオキシエチレン型リン脂質 (N-(モノメトキシポリオキシエチレンカルバミル) ジホスファチジルエタノールアミン)を、モル比1/3/40/20/2.5で用いた。ポリオキシエチレン鎖の平均分子量は5000とした。これに生理食塩水を添加して、リピドヘム濃度を5mMとした溶液を調製した。これを実施例 1 記載のエクストルージョン法によ

り粒径の制御を行った後、アスコルビン酸を 6 mM 添加して硝子容器に封入した。実施例 1 と同じ方法で窒素を通気することにより、三価鉄のヘムは全て還元されて二価鉄のヘムとなり、また酸素分圧は 3 Torr にまで低下し、容器内はほぼデオキシ型のリピドヘム小胞体となった。これを室温にて 3 カ月保存した後の分析では、三価鉄ヘムの増大は認められなかった。また、粒子径は保存前の $42 \pm 21 \text{ nm}$ に対して、保存後は $45 \pm 28 \text{ nm}$ であり、殆ど変化は見られなかった。濁度の上昇は特に認められなかった。

【0 0 6 0】

実施例 6

リピドヘム-トリグリセリド小球体分散液の調製は、リピドヘム (5,10,15,20-テトラキス [$\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-{2',2'-ジメチル-20' (2"-トリメチルアンモニオエチル)ホスホナトキシエイコサナミド}-フェニル] ポルフィナト鉄(II)) / 1-ステアリルイミダゾール (モル比 1/2.5) に、大豆油 ([大豆油] / [ヘム] = 2~4 重量比) を添加し、更に 2 % グリセリン水溶液を加えた後、窒素雰囲気下において水浴下で超音波攪拌することにより行った。この分散液に平均分子量 2000 のポリオキシエチレン結合脂質 (N-(モノメトキシポリオキシエチレンカルバミル) ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン) を、リピドヘムに対して 0.02 mol% 添加してポリオキシエチレン修飾した。分散液 180 mL を 200 mL の硝子容器に小過剰のアスコルビン酸と共に封入し、実施例 1 記載の方法と同様にして窒素バブルして酸素分圧を 2 Torr にまで低下させ、デオキシ型のリピドヘム-トリグリセリド小球体を得た。これを室温にて 4 カ月間保存した後の分析では、鉄三価のヘムの増大は認められず、また粒子径は保存前の $85 \pm 25 \text{ nm}$ に対して、保存後 $86 \pm 28 \text{ nm}$ であり、殆ど変化は見られなかった。

【0 0 6 1】

実施例 7

アルブミン-ヘムの調製は、ヘム誘導体 (2-[8-{N-(2-メチルイミダゾリル)}オクタノイロキシメチル]-5,10,15,20-テトラキス ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-ピバラミド) フェニルポルフィナト鉄(II)) とヒト血清アルブミンをもとに、既報に従って行った (小松ら、人工血液, vol.6, 110-114, 1998)。ヘムが二価鉄の状態で酸素

を結合していることを確認した後、アルブミン-ヘム溶液を硝子容器に封入し、実施例 1 に記載の方法で窒素を通気することにより酸素分圧を 3Torr にまで低下させて、デオキシ型のアルブミンヘムを得た。これを 20℃ にて 5 カ月間保存した後の分析では、三価鉄のヘムの増大は認められず、不溶物の増大は認められなかった。

【0062】

比較例 1

実施例 1 と同様にして調製したポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液の酸素分圧を、無菌的雰囲気下において、大気と同じ 149Torr とした。これをバイアル瓶に密封し、酸素除去を行うことなく、オキシヘモグロビンのままで恒温槽内保存 (40℃) を行った。保存 1, 4, 24 時間後にメト化率を紫外可視吸収スペクトルから測定した。保存に伴ってメト化率は上昇し、保存前の 2.7% から保存 1 時間後には 5 % に、保存 4 時間後には 1 2 % に、保存 2 4 時間後には 3 6 % に増大した。

【0063】

この結果は、ポリオキシエチレン修飾したヘモグロビン小胞体分散液でも、酸素を除去しない場合にはメトヘモグロビンの増大が著しく、本発明と同様の保存安定性が得られないことを示している。

【図面の簡単な説明】

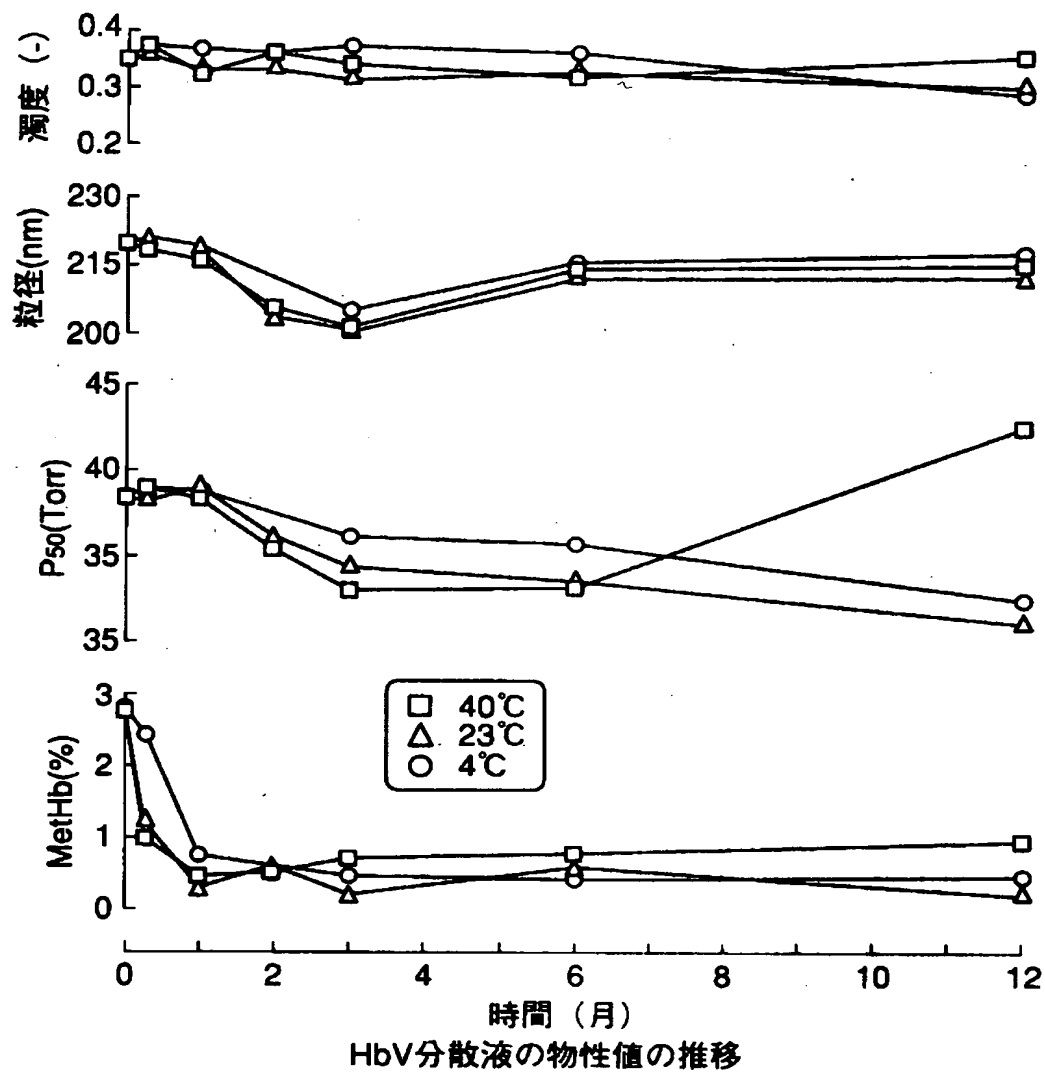
【図 1】

ポリオキシエチレン修飾デオキシ型ヘモグロビン小胞体の保存安定度を示した図である。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酸素輸液の保存安定性を向上させること

【解決手段】 水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体とを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：前記水性分散液から酸素を除去して、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることと；この酸素を除去された水性分散液を不活性ガス雰囲気中で保存することとを特徴とする酸素輸液剤の保存方法

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 AK09904597

【提出日】 平成12年 8月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第253119号

【承継人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【承継人代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 承継人であることを証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 同日提出の手續補足書に添付して提出する。

【物件名】 代理権を証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 同日提出の手續補足書に添付して提出する。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 2 5 3 1 1 9 号
受付番号	5 0 0 0 1 0 0 4 0 5 7
書類名	出願人名義変更届
担当官	小菅 博 2 1 4 3
作成日	平成 1 2 年 9 月 1 2 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100058479

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外
国特許法律事務所内

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 1 8 7 1 9]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都練馬区関町南 2 丁目 1 0 番 1 0 号

氏 名 土田 英俊

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団